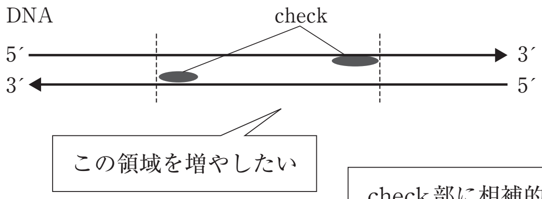
第16講　バイオテクノロジー①

■PCR法　…　特定のDNA領域を増幅する。

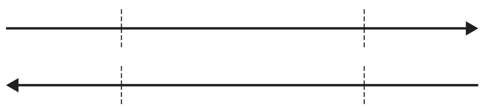


反応溶液に，目的の領域を含むDNA断片，大量のヌクレオチド，DNAポリメラーゼ，大量のプライマーを入れる

check部に相補的に結合する短いDNA断片（RNA断片の場合もあり）ポリメラーゼによるDNA合成の起点となる。方向性に注意が必要。

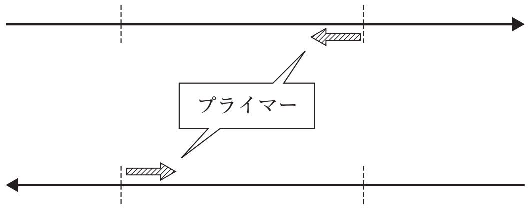
温泉に生息する好熱性細菌より抽出，最適温度は72℃，90℃以上の条件でも熱変性しない。

Step1　95℃にて



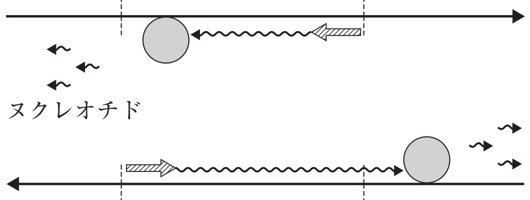
・水素結合がほどけて，２本鎖DNAから１本鎖DNAへ開裂する。

Step2　55℃にて

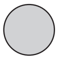


・多量に存在するプライマーがcheck部に結合，部分的に2本鎖を形成することでDNAポリメラーゼの起点となる。

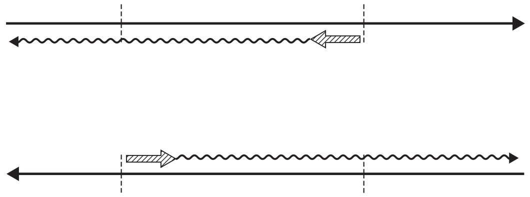
Step3　72℃にて



・最適温度にてDNAポリメラーゼがDNA合成開始

：DNAポリメラーゼ

：新生されたヌクレオチド鎖



Step1からStep3を繰り返すことで，DNAは２倍に増幅される。１サイクル10分程度で終了する。
一晩PCR装置を動かしておくだけで，１分子のDNAから十分な量のDNA断片を得ることが出来る。

©RECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

〈Note〉

ⒸRECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

第16講　演習問題

A

インフルエンザウイルスのゲノムの検出に有効な検査法として，PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法が広く使われている。その一般的な手順は以下のとおりである。

インフルエンザウイルスのゲノムはRNAであるため，まず,［ア］酵素を用いてゲノムRNAと［イ］的なDNAを合成する必要がある。つぎに，こうして合成されたDNAの特定の領域を増幅する。そのためには，一対の［ウ］(増幅したい領域の末端部分に［イ］的な短い1本鎖DNA)が必要である。それらに加えて，DNAの合成には［エ］という酵素と4種類の［オ］が必要である。以上すべてを混合させた溶液を用いて次のような実験操作をおこなう。

① 溶液を約［a］℃で保温する。するとDNAの2本鎖間の結合が切れて，2本の1本鎖DNAに分かれる。
② 溶液の温度を［b］℃にして，①の1本鎖DNAに［ウ］を結合させる。
③ 溶液の温度を約［c］℃にして［エ］をはたらかせると，それぞれの1本鎖DNAに［イ］的なDNAが合成される。
④ ①〜③を繰り返す。

1．空欄［ア］〜［オ］に入る適切な語句を記せ。

2．空欄［a］，［b］，［c］に入る数字として最も適切な組み合わせをA〜Eの中から選べ。

	A	B	C	D	E
a	90	70	60	90	60
b	60	90	70	60	90
c	70	60	90	90	60

3．［ア］はある種のウイルスなどに見られる特殊な現象であり，一般的には<u>遺伝情報はDNAからRNAへと伝えられる</u>。この下線部の過程の名称およびそれを触媒する酵素の名称を答えよ。

4．①で切れる結合の名称を記せ。また，その結合には，［オ］を構成する3つの部分のうちどれが関与するか。その部分の名称(物質名)を記せ。

©RECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

5．現在一般的なPCR法では，特殊な［　エ　］を用いる。通常の［　エ　］を用いて前述の操作をおこなってもDNAは増幅されないからである。たとえば，大腸菌の［　エ　］を用いてPCR法をおこなうためには，a③の操作のたびに［　エ　］を加え，b③の反応は30～40℃でおこなう必要がある。下線部a，bの操作が必要な理由をそれぞれ句読点を含めて20文字以内で記せ。

6．①～③のサイクルを20回おこなうと理論上DNAは約何倍に増えるか。適切な答えをA～Fの中から選べ。

A．50,000　　B．100,000　　C．500,000　　D．1,000,000

E．5,000,000　　F．10,000,000

B

1　次の配列をもつ2本鎖DNAをPCR法で増幅させたい。ただし，2本鎖のうちの一方の鎖の5′側からの配列のみを記してある。PCR法を実行するためには，2種類の短い1本鎖DNAを，次の配列中に示した2ヶ所の2重下線部に対して，それぞれ設計する必要がある。その設計として正しいものを以下の(ア)～(カ)から2つ選び，記号で答えよ。

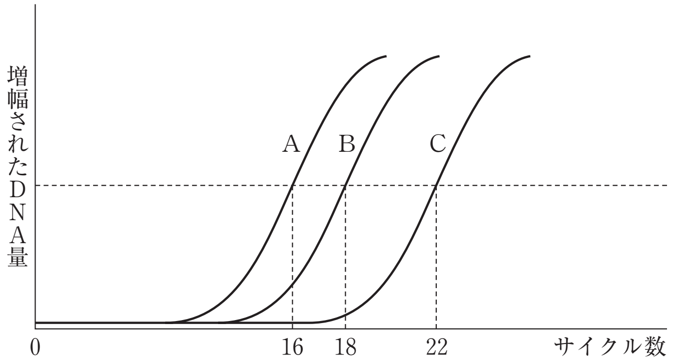
5′－AGCAATCTCTCGATCTCGGGACAGCTAGCTGGGTTTATCTTTCAATT
GGATAGCTGAAATCTAGCTAGGGAGATCATGCTAGCTAGCTATTTCGG
GCCGGTAATGCTAGCTGATCGATTGATCGTTAGCTAGCTGGTTGGGCCG
ATCGTAGGGTCGCTATCGATTCGATCCGCTCTTG－3′

図1

(ア)　5′－AGCAATCTCTCGATCTCG－3′
(イ)　5′－CGATTCGATCCGCTCTTG－3′
(ウ)　5′－CGAGATCGAGAGATTGCT－3′
(エ)　5′－CAAGAGCGGATCGAATCG－3′
(オ)　5′－TCGTTAGAGAGCTAGAGC－3′
(カ)　5′－GCTAAGCTAGGCGAGAAC－3′

©RECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

2　2本鎖DNAに結合する蛍光色素を混合してPCR法を行うと，その光を検出する機器によって増幅中のDNA量を時間を追って測定することができる。A，B，Cの3種類のサンプル溶液を用いて，目的のDNAが正確かつ効率的に増幅されるように調整されたPCR法を同時並行で実行した。その増幅中のDNA量を経時的に測定した結果を図2に示す。A，B，Cのサンプル溶液には，同一生物種由来のDNAが異なる濃度で入っているが，それ以外の条件はすべて同一である。また，この調整されたPCR法では，1サイクルでDNA量が2倍になることを確認している。



一定のDNA量に達したときのサイクル数をA，B，Cのそれぞれについて示す。

図2

(1)　PCR法の実行前にAに含まれていた目的の配列をもつDNAの濃度は，Bにおけるその濃度の何倍であったかを記せ。

(2)　PCR法の実行前にCに含まれていた目的の配列をもつDNAの濃度は，Aにおけるその濃度の何倍であったかを記せ。

ⒸRECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

第16講　確認テスト

DNAの単離とPCR法に関する次の文を読み，以下の各問いに答えよ。

目的の遺伝子と同一の塩基配列をもつDNA断片を得る操作をクローニングといい，遺伝子をクローニングするためには，最初にゲノムのDNAを単離することがふつう行われる。例えば，以下のような一般的な方法により，マウスの肝臓の細胞を材料にして，特定の遺伝子のクローニングが可能である。

⑴　マウスの肝臓をすりつぶしトリプシン溶液を加え，しばらく放置する。このとき溶液の粘性が高まる。

⑵　食塩水を加え，100℃で5分間加熱する。

⑶　溶液をろ過した後，［ 1 ］を加えると，繊維状のDNAが生じる。

⑷　単離したDNAにプライマー，ヌクレオチドなど必要な試薬を加え，特定の遺伝子を以下のような条件のPCR法で増幅させる。このとき，反応の触媒としては高温の溶液中で安定なDNAポリメラーゼを用いるのがふつうである。

PCR法の条件（aからcの操作を順番に行い，この操作を繰り返す）

a　95℃で30秒間加熱する　　b　60℃に冷却して1分間保つ

c　72℃で1分間加熱する

問1　前の文中の［ 1 ］に当てはまる最も適切な語を下の解答群から選べ。

〔解答群〕

①　エンドヌクレアーゼ	②　アミラーゼ	③　ATP分解酵素
④　カタラーゼ	⑤　DNAリガーゼ	⑥　脱炭酸酵素
⑦　RNAポリメラーゼ	⑧　グルコース	⑨　グリセリン
⓪　クエン酸	ⓐ　塩　酸	ⓑ　過酸化水素
ⓒ　エタノール	ⓓ　水酸化ナトリウム	

©RECRUIT HOLDINGS

本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

問２　前の文中の実験におけるPCR法の条件a，b，cにおいてどのような現象が起こっているか，最も適切な記述を下の解答群から選べ。

〔解答群〕

①　ペプチド結合が生じる。
②　ヒストンが結合する。
③　ヌクレオチドから塩基がはずれる。
④　DNAの複製反応が起こる。
⑤　DNAの２本鎖のうち，どちらか一方の鎖が分解される。
⑥　RNAが合成される。
⑦　プライマーがDNAに結合する。
⑧　２本鎖DNAが１本鎖DNAに解離する。

問３　PCR法の原理に関して述べた次に示すＡからＤの記述のうち，正しい記述の組み合わせとして最も適切なものを下の解答群から選べ。

Ａ　200塩基対と400塩基対のDNA領域を増幅させると，増幅回数が同じならば，増幅される400塩基対のDNA断片の数は，200塩基対の場合の半分である。

Ｂ　使用するヌクレオチドは5種類である。

Ｃ　PCR法では，2本鎖の両方をもとにしてDNAが増幅されるため，最終的には，2種類の2本鎖DNA断片がほぼ同量生じることになる。

Ｄ　理論的には，前の文中のaからcの1サイクルで目的とするDNAは4倍に増える。

〔解答群〕

①　Ａのみ	②　Ｂのみ	③　Ｃのみ
④　Ｄのみ	⑤　ＡとＢ	⑥　ＡとＣ
⑦　ＡとＤ	⑧　ＢとＣ	⑨　ＢとＤ
⓪　ＣとＤ	ⓐ　ＡとＢとＣ	ⓑ　ＡとＢとＤ
ⓒ　ＡとＣとＤ	ⓓ　ＢとＣとＤ	ⓔ　ＡとＢとＣとＤ
ⓕ　すべて間違い		

ⒸRECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

＜Note＞

ⒸRECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

第16講　演習問題

A

1．ア　逆転写　イ　相補
ウ　プライマー　エ　DNAポリメラーゼ
オ　ヌクレオチド

2．A

3．転写，RNAポリメラーゼ

4．水素結合，塩基

5．a　酵素が①の操作で熱変性して失活するから。
b　酵素の最適温度が30～40℃付近だから。

6．D

B

1　(ア)，(エ)

2　(1)　4倍
(2)　$\frac{1}{64}$倍

©RECRUIT HOLDINGS

本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

第16講　確認テスト

問1　ⓒ
問2　a　⑧　　b　⑦　　c　④
問3　ⓕ

【解説】

問1　DNA抽出実験では，タンパク質分解酵素や加熱によってタンパク質を取り除き，食塩水にDNAを溶かしたうえで，エタノールを加えることでDNAを析出させる。DNAは水に溶けるが，エタノールには溶けにくい。そのため，エタノールを加えると，溶けきれなくなったDNAが析出してくる。一般的な流れと，処理の効果を確認しておきたい。

問2　PCR法は，DNAの特定の領域を増幅する手法である。反応溶液には，目的の領域を含むDNA断片，DNAヌクレオチド，耐熱性のDNAポリメラーゼ，増幅させる領域を挟み込むプライマーを入れる。PCR法では，これらの混合液を95℃→60℃→72℃の温度で順番に処理し，この操作を繰り替す。それぞれの温度では，

95℃：　熱によって塩基間の水素結合が切断され，2本鎖DNAが1本鎖DNAに解離する。
60℃：　プライマーが増幅させたいDNA領域の両端に結合する。
72℃：　DNAポリメラーゼの最適温度であるため，DNAポリメラーゼによってDNAの複製反応が起こる。

この一連の操作によってDNAの断片数は2倍に増幅される。

問3　Aについて，PCR法では，増幅させるDNA領域の長さによらず一連の操作によって2倍の数に増幅されるため，不適。Bについて，PCR法はDNAを増幅する方法なので，使用するヌクレオチドは，糖としてデオキシリボースを含み，塩基はATCGの4種類となるため，不適。Cについて，PCR法では2本鎖のそれぞれを鋳型として，新しいDNA鎖が合成される。その結果生じる2本の2本鎖DNAは，どちらも同じ塩基配列を持つことになる。2種類の2本鎖DNAが生じることにはならないため，不適。Dについて，PCR法では，一連の操作を1サイクルすることで，目的とするDNA断片の数は2倍に増えるため，不適。

ⒸRECRUIT HOLDINGS

本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。